

審査結果の要旨

氏名 磯谷 一暢

本研究は、肺癌の進展に重要な役割を果たす TGF- β シグナルの制御因子としての TTF1 の作用メカニズムを明らかにすることを目的として、肺腺癌細胞株を用いた系において、TTF1 がどのように TGF- β シグナルを抑制するのか、生化学的手法と ChIP-seq 法を用いた網羅的な解析を試みたものである。この解析により以下のことが明らかになった。

- ① TTF1 の発現のない A549 細胞での TTF1 の過剰発現の検討により、TTF1 は核内にあって、Smad3 のリン酸化と核内移行には影響を与えずに Smad3/4 複合体形成を阻害することが明らかとなった。一分子レベルでの結合を検出できる *in situ* PLA 法を活用して、TTF1 によるこの Smad3/4 複合体乖離作用が、細胞質ではなく、核内のみで行われていること、さらに乖離した Smad3 はそのまま核内にとどまる傾向にあることが明らかとなった。この阻害のメカニズムは、今まで報告されたことのない新しいものである。
- ② Smad3 の標的遺伝子プロモーターへの結合への TTF1 の影響をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) によって検討した。TGF- β 応答性の遺伝子である PAI-1 と Smad7 のプロモーター領域における既知の Smad3 結合部位における検討を行った結果 Smad3 の PAI-1 プロモーターへの結合が TTF1 の過剰発現によって抑制されたことから、TTF1 が Smad3 の標的遺伝子座への TGF- β による結合増強を阻害していることが示唆された。また PAI-1 のプロモーターを用いたルシフェラーゼ活性が TTF1 の過剰発現で抑制された。興味深いことに、Smad binding element のみからなるレポーターでは、この TTF1 による転写抑制効果は認められなかったことから、TTF1 の作用には、標的遺伝子の転写調節領域上の他のシスエレメントが重要であることが示唆された。
- ③ Smad3 のゲノム上の結合部位を ChIP-sequencing (ChIP-seq) 法により網羅的に同定するとともに、その結合に対する TTF1 の役割を解析することとした。H441 を用い、TTF1 を siRNA によりノックダウンし Smad3 の ChIP-seq を行って control siRNA におけるデータと比較を行った。さらに TTF1 についても合わせてその結合部位の網羅的同定を行い Smad3 の結合部位との比較検討を行った。Smad3 結合部位は TGF- β 刺激後 1.5 時間では control siRNA サンプルでは FDR 0.1 % で 8,941 箇所同定されたのに対して、TTF1 の siRNA では同じ同定条件で 14,145 箇所と増加した。一方、Control siRNA 群では Smad3 結合部位 8,941 か所のうち 7,839 か所が TTF1 結合部位と重複したが、TTF1 siRNA 群では Smad3 結合部位は前述のように 14,145 か所に増加するものの、重複部位は 1,009 か所の増加にとどまり、一方で TTF1 と結合部位の重複しない、5,297 か所の新たな結合部位が認められた。以上のことから TTF1 siRNA によって新たに他のゲノム領域に Smad3 結合部位が出現することが示唆された。このことはそれぞれのピークにおける Smad3 結合程度の変化を ChIP-seq でマップされたリード数で定量的に比較した

結果でも同様であった。そして発現マイクロアレイによる解析から、こうした Smad3 の結合強度の変化が標的遺伝子発現と関係することが示唆された。以上のことから、TTF1 の Smad3 への作用は、これまで提唱されていた、クロマチン上の結合部位をめぐる競合ではなく、Smad 複合体の乖離を介した機序を含む、その他の要因によるものであると考えられた。

- ④ ChIP-seq による解析から、PAI-1 領域には複数の Smad3 結合ピークが認められた。その多くは TTF1 の結合ピークと重複せず、TTF1 発現下ではピークが大きく減弱した。一方で転写開始点から 10k bps 下流の PAI-1 遺伝子のコーディング領域に、TTF1 の結合ピークがあり、かつ TTF1 の存在下でも Smad3 の結合ピークが大きく変わらない領域が存在した。TTF1 が Smad3 の DNA 結合部位の分布に影響を与えるとともに、Smad3/4 複合体を核内で乖離することが観察されたことから、この部位において、Smad4 の DNA への結合を確かめるために、ChIPを行った。その結果、TTF1 発現下においても、Smad3 は転写開始点の下流 10kbps の領域に結合しているが、そこでは Smad4 と複合体を形成せず、単独で結合していることが考えられた。また Smad4 は TTF1 存在下には、検討を行った PAI-1 の転写調節領域には結合しないことが示唆された。

以上、本論文では、肺癌細胞において TTF1 が標的遺伝子上で Smad3/4 複合体の乖離を促すとともに Smad3/4 の結合部位に影響を与え、TGF- β による転写調節に影響を与えているという、いままでに報告されていない新たなシグナルの制御機構の存在を示唆した。これは今後の転写因子研究に重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。